

氏名（本籍）	平井 一帆(東京都)
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第98号
学位授与の日付	平成29年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	光合成微生物におけるトリアシルグリセロール関連化合物合成能と 生理学的意義
論文審査委員	(主査) 都筑 幹夫 教授 渡邊 一哉 教授 玉腰 雅忠 准教授 藤原 祥子 准教授

論文内容の要旨

真核生物において、油脂の主成分は中性脂質である Triacylglycerol(TG)であり、これは炭素やエネルギーの貯蔵物質として生産される。現在、食用油やバイオディーゼル燃料の原料は主に作物の油脂から得られている。微細藻類は、高等植物より高いバイオマス生産能とストレス下での高度な TG 生産能を有するため、新たな油脂生産系として近年注目されてきた。微細藻類では窒素、リン、硫黄や鉄の欠乏、さらに塩ストレス、高 pH 条件、強光等のストレスが単独で TG や炭化水素等の中性脂質蓄積を誘導すること、そしてその効果は窒素欠乏条件下で特に大きいことが知られている。同時にこの窒素欠乏下では、TG 蓄積により、余剰なエネルギーや還元力が脂肪酸の合成により消費され、これが細胞のレドックスバランスを適度に保つ、ひいては活性酸素の発生を抑制するとされる。これまでに本研究室では、緑藻 *Chlorella kessleri* をガラス繊維フィルター上で緩やかに風乾することで、窒素欠乏条件と同程度までに TG 蓄積が誘導されることを報告している。この条件は窒素欠乏条件等と異なり、培地交換の手間や、脂質抽出のための細胞の乾燥に係る電力が削減でき、TG 生産の経済性の向上に有望な手段である(Shiratake *et al.*, 2013)。風乾条件下、*C. kessleri* 細胞には脱水、そして培地を除去したことによる全栄養制限条件という複合ストレスが加わるが、TG 蓄積誘導に関わる環境因子は特定されないままである。

一方、葉緑体の祖先とされ、光合成生物のモデル生物として用いられるシアノバクテリアについては、*Nostoc commun* や *Spirulina platensis* で TG が蓄積したとの報告があるが、ここでは本来シアノバクテリアには存在しない phosphatidylcholine 等の脂質も観察されてお

り、検出された TG が他生物由来である可能性が疑われる。*Nostoc punctiforme* では、細胞より精製した脂肪滴に TG が含まれていたと報告されたが、この TG の同定は単に TLC での Rf 値に基づいているに過ぎない。一方で、*Synechococcus* sp. PCC 7942 等では TG が存在しないとの報告もある。以上のように、シアノバクテリアにおいて TG の存在は曖昧なままである。

申請者は、光合成微生物における TG 代謝やその生理的役割に関する知見を深めるため、以下の研究を行った。(1) *C. kessleri* において、風乾条件下、TG 蓄積を誘導する環境因子を特定するために、*C. kessleri* を液体培養中で細胞の脱水を伴う高浸透圧条件、あるいは全栄養制限条件、もしくは両者の複合ストレス条件下で培養し、TG 蓄積の度合いを比較した。更にその結果をもとに、安価な海水を用いる経済的な、そして風乾条件よりもはるかに TG 蓄積誘導効果の大きい TG 生産系を開発した。(2) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下、PCC 6803)において、酵素学的に TG と認められる化合物を単離し、その合成に関わる遺伝子の同定と、同遺伝子の改変株を用いて TG の生理的役割を探った。

(1) 緑藻 *Chlorella kessleri* における、高浸透圧、栄養欠乏の各単独ストレスあるいはこれらの複合ストレスによる TG 蓄積誘導

本研究ではまず、Sorbitol(0.3-0.9 M)または NaCl(0.15-0.45 M)の 2 種類の溶質を用い、*C. kessleri* の高浸透圧下での培養が細胞内の TG 蓄積へ及ぼす影響を調べた。通常条件下では TG はほとんど検出されなかったが、各溶質で、高浸透圧の強度が高い程生育が抑制され、それに伴い総脂質に対する TG の割合は脂肪酸ベースで増加した。その結果、2 日間の培養で 0.9 M Sorbitol または 0.45 M NaCl 存在下、TG は各々、総脂質の 48.5 mol%, 75.3 mol%に達した。同時に、ここで認められるように、同程度の浸透圧下、NaCl は Sorbitol より顕著な TG 蓄積誘導効果を示した。NaCl の場合、解離した Na^+ および Cl^- が細胞内へ即時に流入し、細胞内のイオン恒常性を乱す。高濃度の NaCl 存在下では、高浸透圧ストレスとイオンストレスの複合ストレスが負荷されるため、Sorbitol 存在下よりも TG 蓄積を強く誘導したと考えられた。TG 蓄積とは別に、高浸透圧ストレスは膜脂質合成を促すことが示唆された。例えば、0.3 M あるいは 0.6 M Sorbitol 存在下では、2 日間の培養で細胞の生育抑制が見られるにも関わらず、培養液量あたりでの極性脂質の量は通常培養時の 2 倍以上に増えていた。したがって、高浸透圧下では膜脂質および TG 合成に共通する中間代謝産物(脂肪酸やホスファチジン酸)の合成系が強力に活性化したと考えられた。種子植物では、脱水を伴う凍結条件下、monogalactosyl diacylglycerol(MGDG)が diacylglycerol(DG)に分解され、さらに TG がこの DG のアシル基転移により生成し、脂肪滴に貯蔵される。つまり、非二重層形成脂質である MGDG と DG は TG へと形を変え、それが膜から隔離されることにより、膜構造は安定に維持されると考えられている。*C. kessleri* における、高浸透圧下での、TG や膜脂質合成系の活性化の機構やその生理的意義は今後の研究課題である。

次に、*C. kessleri* を通常条件の 1/100 の希釈培地(全栄養制限)で 2 日間生育させたところ、生育の抑制に伴い TG が蓄積し、総脂質あたりの 40 mol%に達した。同時に膜を構成する極

性脂質の増加は細胞の増殖と同じく、抑制された。一方、高浸透圧条件のうち低強度のものと栄養制限を複合して課すことで、TG 蓄積量が飛躍的に増加することが認められた。すなわち、0.3 M Sorbitol あるいは 0.15 M NaCl を、全栄養制限と組み合わせると、総脂質あたりの TG の割合は各々 60 mol% を越え、各単独ストレスによる TG 蓄積の相加的な効果として認められた。その上、培養液量あたりでの TG 生産量の増加は両ストレスの相乗的效果を示した。そしてこの複合ストレス条件は、3 倍希釈した人工海水(0.15 M NaCl を含み、窒素やリンの主要栄養素が乏しい)、あるいは実際の海水を同様に希釈することで再現された。3 倍希釈人工海水を用いて培養した *C. kessleri* の TG 含量は、1 日目で総脂質あたり 64 mol% にまで急増し、細胞乾重量あたりでは僅か 3 日で 27 weight% に達した。これと同レベルの TG 蓄積は、例えば窒素欠乏培養における *Chlorella pyrenoidosa* では 5 日間を要するのに比べると、複合ストレスは短期間での誘導が可能と言えた。一方、*Chlamydomonas reinhardtii* では、0.3 M Sorbitol 以上の高浸透圧ストレスで生育が激しく阻害され、TG 蓄積誘導も見られず、緑藻間での高浸透圧応答機構の差が認められた。したがって、高浸透圧を利用した TG 生産系には藻類種の選択が重要であることが明らかになった。

以上より高浸透圧ストレスは、*C. kessleri* において TG 蓄積の新規なストレスとなること、栄養欠乏ストレスとの複合は TG 蓄積をより強力に誘導することが示された。これにより、空気乾燥による TG 蓄積は、脱水と栄養欠乏の複合がストレスとなり誘導されたと理解された。更に、希釈海水を用いる経済的な TG 生産系が開発された(Hirai *et al.*, 2016)。

(2) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における TG 合成能の検討と合成酵素遺伝子

PCC 6803 から全脂質を抽出し、ヘキサン系の展開溶媒を用いた TLC に供したところ、TG マーカーと同等の Rf 値を示す中性脂質(Syn-NL)が見出された。次に、Syn-NL に TG lipase を作用させると、その分解産物には DG, monoacylglycerol および脂肪酸が含まれることが TLC の Rf 値によって示唆された。更に、Syn-NL を塩酸メタノールでメタノリシスすると、炭素数 16 または 18 の脂肪酸のメチルエステル化物およびグリセロールの生成が、各々 GC と TLC で確認された。以上から、Syn-NL には TG が含まれることが示された。Syn-NL を、100 % トルエンを展開溶媒とした TLC に供すると、TG マーカーと同等の移動度を示す TG と共に、より Rf 値の高い脂質(Syn-NL-2)が検出された。単離した Syn-NL-2 は、そのメタノリシスの結果、C16-18 脂肪酸のメチルエステルとグリセロールの生成が確認されたため、少なくとも C16-18 アシル基を含む TG であると考えられた。

通常の生育下、Syn-NL に含まれる脂肪酸量は、総脂質に対して僅か 0.4 % 程度と微量で、また、緑藻等で高度な TG 蓄積がみられる窒素、硫黄またはリンの欠乏や高 NaCl 濃度条件でも大きく増えることはなかった。したがって、PCC 6803 における TG 代謝系は、炭素やエネルギーの貯蔵や余剰な還元力の消費といった、緑藻にみられる役割は持たな

いと考えられた。

TG 合成の最終段階に関わる遺伝子の候補を、他生物の既知の遺伝子のアミノ酸配列を元に、PCC 6803 ゲノム上で Blast 検索を行ったところ、唯一、diacylglycerol acyltransferase 2 の遺伝子、*DGAT2* のホモログ(ここでは *datA* と称す)が発見された。*DatA* は、ヒトの *DGAT2* と 24 % のアミノ酸配列の相同性が認められ、かつ *DGAT2* の 3 つのコンセンサス配列の全てを有していた。PCC 6803 において *datA* 遺伝子を破壊した株($\Delta datA$)では Syn-NL が消失した。逆に *datA* を過剰発現した株では Syn-NL 蓄積量は増加した。以上より *datA* は Syn-NL 合成に関与する遺伝子として同定された。

野生株と $\Delta datA$ では、通常の培養条件では生育に差が無く、*datA* は通常の生育には必須ではないことが明らかになった。更に $\Delta datA$ は膜脂質組成にも大きな影響は認められず、*datA* は膜脂質代謝には関与しないと考えられた。ところが、 $\Delta datA$ は NaCl を添加した静置培養で、野生株に比べ、顕著な生育抑制を見せた。例えば 0.3 M NaCl 存在下、一週間の静置培養で、野生株は沈殿として生育すると同時に、液面にも沈殿とほぼ同量の細胞凝集体をフィルム状に形成した。一方、 $\Delta datA$ は沈殿での生育は野生株と同程度であったが、液面のフィルム構造を全く形成せず、全体の生育は野生株の半分にとどまった。したがって、PCC 6803 における *DGAT2* ホモログ遺伝子 *datA* は高 NaCl 濃度下、液面でのフィルム形成に重要な役割を果たし、これが塩耐性の増強に重要であることが示唆された。シアノバクテリアのゲノムデータベースより検索したところ、*datA* は PCC 6803 以外にも、同じく淡水性の、あるいは沿岸性のシアノバクテリアに認められたが、絶対海洋性のシアノバクテリアには存在しなかった。*datA* ホモログを持つ沿岸性のシアノバクテリアのうち、*Synechococcus* sp. PCC 7002 (以下、PCC 7002)でも TG と考えられる脂質が観察された。さらに PCC 7002 では、*datA* の破壊により、この脂質が検出されなくなり、同時に NaCl 存在下、液面上でのフィルム形成能が低下した。したがって PCC 7002 でも、*datA* は TG 合成に必須で、フィルム形成を通した塩耐性獲得に重要であると示唆された。*datA* ホモログは塩濃度の変化に曝されやすくなる淡水性や沿岸性の多くのシアノバクテリアに認められたことから、TG 代謝系を介した塩耐性獲得機構はこれらのシアノバクテリアに広く保存されている可能性があると考えられた。

緑藻におけるストレス条件下での TG 蓄積は、炭素やエネルギー源の貯蔵の他、細胞内のレドックスバランスの維持機構としても機能する。本研究では、この TG 蓄積機能が緑藻 *C. kessleri* において、脱水を伴う高浸透圧ストレスにより誘導されることが新規に見出だされ、更に栄養欠乏との相加的な TG 蓄積誘導効果が認められたことから、風乾条件下、TG 蓄積は脱水と全栄養制限の両条件の共同により強く誘導されたと結論づけた。その上で、希釈海水を利用することで、TG 含量が 3 日で細胞乾重量の 27 % に達する高効率な、そして経済的な TG 生産系が新しく提案された。一方で、葉緑体のモデル生物であるシアノバクテリアのうち PCC 6803 が、条件によらず僅かな量の TG を産生することを、その合成系酵素遺伝子 *datA* の

同定とともに示した。PCC 6803 における TG 合成系は、緑藻とは異なり、貯蔵やエネルギー代謝には大きな役割を持たず、しかし高塩濃度下での生存を有利にする、液面上でのフィルム状細胞凝集体の形成という生態形質に関与することが示唆された。

参考文献

Shiratake, T., Sato, A., Minoda, A., Tsuzuki, M. and Sato, N. Air-drying of cells, the novel conditions for stimulated synthesis of triacylglycerol in a green alga, *Chlorella kessleri*. *PLoS One* 8, e79630 (2013)

Hirai, K., Hayashi, T., Hasegawa, Y., Sato, A., Tsuzuki, M. and Sato N. Hyperosmosis and its combination with nutrient-limitation are novel environmental stressors for induction of triacylglycerol accumulation in cells of *Chlorella kessleri*. *Sci. Rep.* 6, 25825 (2016)

審査結果の要旨

光合成微生物を用いたバイオ燃料の生産に対する社会の期待は大きい。しかし、細胞の増殖速度や生産効率等、課題も多い。また、光合成微生物は多様で、貯蔵脂質の合成やその条件となるストレスに関する知見も十分とはいえない状況である。そこで、申請者は、光合成微生物の貯蔵脂質合成に関する研究を行った。

まず、大量培養による増殖のしやすい緑藻クロレラで、脱水乾燥条件下での中性脂質であるトリアシルグリセロール (TG) の蓄積が見出された。そこで、種々のストレス条件及び、その複合条件による TG 蓄積を調べた。その結果、高浸透圧ストレスと栄養欠乏ストレスが単独で TG 蓄積に影響し、両ストレス存在により蓄積量が相乗的に増加し、総脂質あたり 60 mol% に達することを明らかにした。さらに、海水の影響を調べたところ、希釈することで TG 生産が有効であることも示した。しかし、クロレラでは、遺伝子組換えの技術がまだ未開発のため、詳細な解析には適さないため、クラミドモナスでも解析したが、高浸透圧に対する耐性が低く、TG 蓄積の顕著な増加は見出せなかった。

そこで、遺伝子組換えの容易なシアノバクテリアにおける貯蔵脂質の解析とその合成に関する遺伝子の探索を行った。シアノバクテリアでは、種によって TG 蓄積の有無が異なり、まだ統一された結論に達していない。そこで、*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、中性脂質の分析を行ったところ、TG が含まれていることを確認した。しかし、ヘキサン系の展開溶媒を用いた薄層クロマトグラフィ (TLC) で、TG と同じ R_f 値を示す中性脂質が微量に存在することも明らかになった。この中性脂質は、100%トルエンによる TLC で分離することができた。TG lipase 処理とメタノリシスにより、mono- 及び diacylglycerol、さらに C16-18 アシル基を含む脂質であることを示した。

次に、TG 合成に関わると予想される遺伝子を Blast 検索で探したところ、diacylglycerol acyltransferase 2 の遺伝子、*DGAT2* のホモログ (*datA*) を見出した。*datA* 遺伝子は原核生物で最初であるが、その変異株の作製に成功した。△*datA* 株では、TG も類似の中性脂質も共に合成できず、生理特性の変化も認められた。さらに、過剰発現株を作製したところ、TG の顕著な増加が認められたことから、*datA* 遺伝子が中性脂質合成に関与していることが明らかとなった。また、このとき、細胞は液面上にフィルム状に広がることも見出した。

提出論文、口頭発表と質疑応答を審査した結果、博士の学位に合格と評価した。